Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle

Na^+-K^+-ATPase in isolierten Nephronsegmenten der adrenalektomierten Ratte: Hemmung des Aldosteroneinflusses mit Actinomycin D

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jutta Schmid geb. Burchartz
aus Stuttgart-Bad Cannstatt
1983

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle

Na^+-K^+-ATPase in isolierten Nephronsegmenten der adrenalektomierten Ratte: Hemmung des Aldosteroneinflusses mit Actinomycin D

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jutta Schmid geb. Burchartz
aus Stuttgart-Bad Cannstatt
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Ritter
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Bohle
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. A. Wendel

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	4
1. Experimente	4
2. Statistische Auswertung	11
3. Bezugsquellen	13
Ergebnisse	14
Diskussion	17
1. Diskussion der vorliegenden Ergebnisse	17
2. Induktionshypothese	20
3. Funktion des AIP	27
4. Schlußfolgerung	36
Zusammenfassung	38
Zahlentabellen	40
Literaturverzeichnis	45
Nachwort	56

ABKÜRZUNGEN

α	vorgegebene Signifikanzgrenze, Irrtumswahrscheinlichkeit
ADP	Adenosindiphosphat
AIP	aldosteron-induziertes Protein
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTI	distaler Tubulus, Innenstreifen des äußeren Marks (medullärer Teil der aufsteigenden Henle'Schleife)
EC	Enzym-Code
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3)
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
MKH	Mol umgesetztes Substrat pro kg Trockengewicht und Stunde
n	Stichprobenumfang (Zahl der Einzelwerte)
ν	kritischer Wert bei Signifikanzprüfung
NADP(H_2).....	Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat
Na^+-K^+-ATPase...	durch Na^+ und K^+ stimulierte Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3)
PAS-Färbung	Färbung mit Perjodsäure-Schiffs Reagens
PE	Polyäthylen
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.43)
PGM	Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1)
P_i	anorganisches Phosphat
PTC	proximaler Tubulus, pars convoluta
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger-RNA
s	Standardabweichung
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Prüfgröße des U-Tests
$\bar{x}$	Mittelwert

EINLEITUNG

Der aktive Transport von Natrium-Ionen stellt die Hauptaufgabe der resorptiven Leistung der Niere dar. Er wird von Aldosteron, dem mineralocorticoid wirksamen Hormon der Nebennierenrinde, reguliert; damit wird die Natrium-Ausscheidung den jeweiligen Erfordernissen des Organismus angepaßt. Der Mechanismus dieser Regulation an den Zellen des Erfolgsorgans ist in seinen Einzelheiten noch nicht vollständig bekannt.

Der aktive Na^+-Transport wird bewerkstelligt von der Na^+-K^+-ATPase; sie ist die enzymatische Grundlage der "Na-Pumpe" der Zelle (57, 60). Sie bezieht die für den Transport notwendige Energie aus der Spaltung von ATP, die sie in Ionenbewegung entgegen dem Konzentrationsgradienten umsetzt: Na^+ wird aus der Zelle heraus-, K^+ hineintransportiert. Damit sorgt sie für die Aufrechterhaltung der typischen niedrigen Na^+- und hohen K^+-Konzentration im Inneren aller Zellen (29, 57). Entsprechend ihrer Funktion ist sie in der Zellmembran lokalisiert. In der Niere schafft sie darüber hinaus, durch ihre Tätigkeit vorwiegend in den basolateralen Anteilen der tubulären Zellmembranen, die Voraussetzung für den vom Tubuluslumen zu Interstitium und Gefäßen gerichteten Na^+-Transport (13, 30, 31, 50).

Für die hormonelle Regulation des renalen Na^+-Transports erschiene eine direkte Beeinflussung der enzymatischen Grundlage dieses Transports, also der Na^+-K^+-ATPase, physiologisch sinnvoll. Daß Aldosteron tatsächlich die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität für die Regulation des Na^+-Transports an der Niere steuern könnte, wird nahe-

gelegt durch die zeitliche Parallelität der Aldosteronwirkungen auf Enzym und Transport (Übersicht bei 53).

Aldosteron wirkt auf den Na^+-Transport über die Induktion eines Proteins, d.h. über DNA-abhängige RNA-Synthese (Transcription) und nachfolgende Proteinsynthese (Translation). Diese sog. Induktionshypothese gründete sich auf Befunde am experimentellen Modell der isolierten Krötenblase (Übersicht bei 44) und wurde auch für den Na^+-Transport der Säugetierniere belegt (1, 9, 39, 43, 61, 64).

Falls ein Angriffspunkt für die Aldosteronsteuerung des Na^+-Transports in der Na^+-K^+-ATPase zu suchen ist, müßte die Na^+-K^+-ATPase demselben Regulationsmechanismus unterliegen wie der Na^+-Transport. Das Enzym müßte also wie der Transport von der durch Aldosteron ausgelösten Induktion betroffen werden.

Hierin liegt die Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Untersucht wird ein Teilschritt der Proteininduktion, nämlich die DNA-abhängige RNA-Synthese, die Transcription im Zellkern. Mit dem RNA-Synthese-Hemmer Actinomycin D soll geprüft werden, ob die Aldosteronwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase von der intakten Transcription abhängig ist.

Als Versuchstier dient die zur Ausschaltung endogenen Aldosterons adrenalektomierte Ratte. Nach einer einmaligen Gabe von Aldosteron und Actinomycin D in vivo wird die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase in einzelnen Nephronsegmenten gemessen. Aus der Vielzahl der morphologisch und funktionell unterschiedlichen Tubulusabschnitte des Nephrons wird für die Untersuchung je ein Abschnitt aus dem proximalen und distalen Teil ausgewählt. Vom dista-

len Nephron, dem Hauptort der Aldosteronwirkung, wird der dicke aufsteigende Teil der Henle'schen Schleife in der Medulla (DTI) untersucht, vom proximalen das Konvolut im Cortex (PTC), das ebenfalls als Ort der Aldosteronwirkung ausgewiesen ist (15, 63). [1)]

Isolierte Segmente von PTC und DTI werden durch Mikrodissektion aus lyophilisierten Nierenschnitten gewonnen. Die enzymatische Analyse solcher winzigen Gewebsmengen erfordert eine spezielle Technik. Die Methode wird so der strukturellen Heterogenität der Niere in besonderem Maß gerecht.

---

1) Ein Teil der hier vorgelegten Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht (48, 55).

MATERIAL UND METHODE

1. Experimente

Die hier verwendete Methode ist als "Quantitative Histochemie am Nephron" beschrieben (51). Sieben Schritte folgen aufeinander: Nierengewebe wird aus entsprechend vorbereiteten Tieren gewonnen (1), sehr schnell gefroren (2), geschnitten (3) und lyophilisiert (4). Einzelne Nephronsegmente werden aus dem Gewebsschnitt herauspräpariert (5), gewogen (6) und einer mikrobiochemischen Analyse unterzogen (7).

1.1. Vorbereitung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 13 männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g aus der Zucht von Ivanovas/Kisslegg. 8 der Ratten wurden 12-14 Tage vor der Tötung adrenalektomiert. Dazu wurde in Äthernarkose die Bauchhöhle von einem medianen dorsalen Fellschnitt aus eröffnet, die Nebennieren freigelegt und entfernt. Die adrenalektomierten Ratten erhielten 1%ige NaCl-Lösung statt Trinkwasser, außerdem Altromin-Standardfutter wie die gesunden Ratten. Am 10. postoperativen Tag wurde die Vollständigkeit der Adrenalektomie mit dem Wasserbelastungstest (59) überprüft: Leitungswasser, 5 ml/100 g Körpergewicht, wurde mit der Schlundsonde zugeführt und die Halbwertszeit der Ausscheidung durch Wiegen in 15-minütigen Abständen ermittelt. Sie ist wegen des Wegfalls der tubulusabdichtenden Glucocorticoide bei adrenalektomierten Ratten verlängert (auf 195 $\pm$ 4 min gegenüber 51 $\pm$ 2 min bei gesunden Ratten (59)). Nur bei positivem Wasserbelastungstest wurden die Tiere für die Experimente

weiterverwendet.

Die Ratten wurden in 5 Versuchsgruppen eingeteilt: 3 der adrenalektomierten Tiere bildeten die Hauptgruppe. Sie erhielten eine intraperitoneale Injektion von 100/ug /100 g Körpergewicht Actinomycin D, gelöst in 0,9%iger NaCl, 45 min später eine intraperitoneale Injektion von 6/ug/100 g Körpergewicht Aldosteron, gelöst in 0,9%iger NaCl, und wurden weitere 60-90 min später durch Dekapitation getötet. Die erste Vergleichsgruppe bestand aus 3 adrenalektomierten Tieren, die nur die Aldosteroninjektion, 60-90 min vor Tötung, erhielten. Die zweite Vergleichsgruppe bildeten 2 bis zur Tötung unbehandelte adrenalektomierte Tiere. In der dritten Vergleichsgruppe erhielten 2 gesunde Tiere die Actinomycininjektion, 45 min später eine intraperitoneale NaCl-Injektion; 60-90 min danach wurden sie dekapitiert. Die vierte Vergleichsgruppe bestand aus 3 unbehandelten gesunden Tieren.

1.2. "Gefrierstop"

Unmittelbar nach der Dekapitation wurden die Nieren aus der ventral eröffneten Bauchhöhle entnommen und zu Gewebskeilen geschnitten, die auf Gefrierblöcke montiert und in flüssigen Stickstoff gelegt wurden.

Dieser "Gefrierstop", das sehr schnelle Einfrieren des Gewebes, hat mit der nachfolgenden Lyophilisation den Zweck, das Gewebe in nahezu unverändertem, nativem Zustand zu konservieren. Vermieden werden einerseits autolytische oder chemische Veränderungen, andererseits Zerstörung von Mikrostrukturen durch Eiskristallbildung, da das Gewebswasser bei so rascher Abkühlung amorph zur unterkühlten Schmelze erstarrt, einem glasähnlichen Zustand, aus dem es bei der Lyophilisation durch Sublimieren entfernt wird.

1.3. Herstellung von Gefrierschnitten

Vom gefrorenen Gewebe wurden auf dem Mikrotom eines Kryostaten bei -20°C Schnitte von 16 µm Dicke angefertigt. Jeweils der mittlere dreier aufeinanderfolgender Schnitte wurde der wäßrigen PAS-Färbung (51), die andern beiden der Lyophilisation zugeführt. Der gefärbte Schnitt diente der Identifizierung der Nephronsegmente bei der späteren Dissektion seiner Nachbarschnitte.

Die wäßrige PAS-Färbung ist insofern geeignet, als sich proximale und distale Tubulussegmente sicher unterscheiden lassen: Zellen des proximalen Segments zeigen außer einem blassen Cytoplasma und basal liegenden Kernen den zinnoberrot angefärbten Bürstensaum; den Zellen des distalen Segments fehlt der Bürstensaum, ihr Cytoplasma färbt sich kräftig violett und die Kerne liegen eher apical.

1.4. Lyophilisation

Die für die Lyophilisation vorgesehenen Schnitte wurden in speziellen Schnittkammern (51) in die Lyophilisierröhre gebracht. Diese wurde in einer Tiefkühltruhe (-40°C) an eine Hochvakuumpumpe angeschlossen. Das von der Pumpe erzeugte Druckgefälle wurde durch ein zusätzliches Wasserdampfdruckgefälle verstärkt: Das Röhrensystem zwischen Pumpe und Lyophilisierröhre ragte in zwei Kühlfallen ein, die aus mit Trockeneis und Aceton gefüllten Dewar-Gefäßen bestanden. Dort fiel die Temperatur auf -70°C ab, so daß sich der vom Gewebe abgesaugte Wasserdampf niederschlug.

Die Dauer der Lyophilisation betrug 16 h und das dabei erzeugte Vakuum 5×10^{-3} Torr. Die Lyophilisierröhren mit dem gefriergetrockneten Gewebe wurden in der Tiefkühltruhe bei -40°C aufbewahrt.

1.5. Dissektion

Die Dissektion der Schnitte und der erste Teil der biochemischen Analyse, im nl-Bereich, fanden in einer Klimakammer statt, bei konstanter Temperatur von +18°C und konstanter relativer Luftfeuchtigkeit von 40%.

Das gelagerte Gewebe wurde in der an das Pumpensystem angeschlossenen Lyophilisierröhre auf Zimmertemperatur gebracht. Die Dissektion der Nephronsegmente erfolgte aus dem lyophilisierten Nierenschnitt, der unter einem Stereomikroskop auf einer Mattglaspräparierplatte zur Betrachtung im Durchlicht auflag. Der Vergleich der Strukturen mit denen im gefärbten Nachbarschnitt, unter einem zweiten Mikroskop, erlaubte die Identifizierung der Tubulusabschnitte. Disseziert wurden die Tubuli mit entsprechend angefertigtem Präparierbesteck (51), transportiert mittels elektrostatischer Haftung an montierten Augenbrauenhaaren (51). Eine α-Strahlenquelle schützte während der Dissektion und des Transports gegen zu starke elektrostatische Aufladung.

1.6. Wiegen

Die Tubuli wurden, auf einem Objektträger und mit einem Mikromanipulator (51), zu einer Quarzfadenwaage (nach Lowry (51)) gebracht und dort gewogen. Der Bereich der verwendeten Quarzfadenwaage erstreckte sich linear von 2-55 ng, die PTC-Gewichte lagen um 15-30 ng, die DTI-Gewichte um 10-25 ng.

1.7. Biochemische Analyse

Die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase wird durch Messung des aus der ATP-Spaltung hervorgehenden Produkts P_i bestimmt. Da unter den Meßbedingungen verschiedene ATPasen innerhalb der Zelle reagieren, muß die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität aus der Differenz der Gesamtaktivität ("Total-ATPase") und der Restaktivität bei

Zusatz von Ouabain, das die Na^+-K^+-ATPase spezifisch hemmt (57), und in Abwesenheit von K^+ (ouabain-insensitive ATPase, "Mg^{2+}-ATPase") errechnet werden. Für einen Na^+-K^+-ATPase-Aktivitätswert sind also zwei Messungen an Anteilen desselben Tubulus erforderlich.

Die Menge P_i, die die Na^+-K^+-ATPase eines Tubusquerschnitts in der gegebenen Reaktionszeit abspaltet, liegt im Bereich von 10-90 x 10^{-12} Mol, was eine hohe Empfindlichkeit der Meßmethode erfordert. Sie läßt sich erreichen durch Reduktion der Reaktionsvolumina für die Enzymreaktion des Einzeltubulus auf den nl-Bereich mit anschließender Multiplikation des (nochmals umgesetzten, s.u.) Reaktionsprodukts um einen konstanten Faktor. Danach liegen auch in grösseren, der Messung zugänglichen Volumina meßbare Konzentrationen vor.

Die Multiplikation wird durch "enzymatisches Cycling" erreicht (51). Dabei wird eine konstante Menge von $NADPH_2$ (für jedes P_i aus der ATP-Spaltung ein $NADPH_2$) abwechselnd oxidiert und reduziert. Die jeweiligen Reaktionspartner der Oxidation und Reduktion und die katalysierenden Enzyme werden im Überschuß vorgegeben, so daß sich die reduzierten bzw. oxidierten Produktmoleküle der Reaktionspartner ansammeln, und zwar pro Kreislauf eines $NADPH_2$-Moleküls je ein reduziertes und ein oxidiertes Produktmolekül. Hat das $NADPH_2$-Molekül in einer Stunde den Kreislauf x-mal durchlaufen, sind x Produktmoleküle jeder Sorte entstanden. x pro Zeiteinheit wird als Cyclingrate bezeichnet. Sie stellt den Multiplikationsfaktor dar und beträgt beim hier benutzten System 8000 Zyklen/h.

Die übrigen Reaktionen dienen der biochemischen Verkettung von abgespaltenem P_i, Cycling und fluorimetrischer Messung.

1.7.1. ATPase-Reaktion

$$ATP \xrightarrow{Na^+\text{-}K^+\text{-ATPase}} ADP + \underline{P}_i$$

Die dissezierten und gewogenen Tubulusabschnitte wurden in die Vertiefungen einer Teflonplatte gelegt, je 388 nl Reagens I (für Bestimmung der Total-ATPase:

Tris 0,1 M, pH 7,4, NaCl 55 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 5 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,05%; für Bestimmung der ouabain-insensitiven ATPase dieselbe Lösung ohne KCl und mit Zusatz von Ouabain 2 mM) zugegeben und das Reaktionsgemisch mit 2 Tropfen Paraffinöl zur Vermeidung von Verdunsten bedeckt (Öltröpfchen-Technik nach Lowry (51)). Unter Eiskühlung der Teflonplatte wurden durch das Öl hindurch zu jeder Reaktionslösung 201 nl einer 6,25 mM ATP-Lösung pipettiert. Die Reaktion lief 10 min lang bei einer 37°C-Inkubation ab und wurde durch eine Inkubation von 3,75 min bei 115°C abgebrochen.

1.7.2. Phosphat-Bestimmung

$$\underline{P}_i + \text{Glykogen} \xrightarrow{\text{Phosphorylase a}} \text{Glucose-1-P}$$

$$\text{Glucose-1-P} \xrightarrow{\text{PGM}} \text{Glucose-6-P}$$

$$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6P-Gluconolacton} + \underline{\text{NADPH}_2}$$

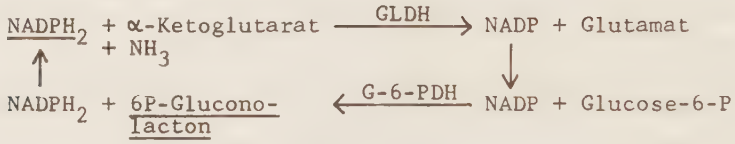
In die Vertiefungen einer zweiten Teflonplatte wurden je 1203 nl Reagens II (für Phosphatbestimmung: Glykogen 0,08%, NADP 0,3 mM, Phosphorylase a 35 µg/ml, PGM 3 µg/ml, G-6-PDH 1 µg/ml, Imidazol 0,05 M, pH 6,9, $MgCl_2$ 0,5 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,05%, 5'AMP 10 mM) gegeben, mit Öl bedeckt und hindurch je 201 nl des Inkubats aus der ATPase-Reaktion dazugegeben. Die Inkubation dauerte 35 min bei 37°C.

1.7.3. Zerstörung von überschüssigem NADP

Je 388 nl des zweiten Inkubats wurden in 250 µl einer 0,04 N NaOH-Lösung mit 0,5 mM L-Cystein, in PE-Röhrchen unter Kühlung, einpipettiert. Auf die Inkubation von

10 min bei 60°C folgte Eiskühlung und kurze Zentrifugation.

1.7.4. Cycling-Reaktion



Je 6/ul des dritten Inkubats wurden in 25/ul Reagens III (für Cycling-Reaktion: α-Ketoglutarat 5 mM, Ammoniumazetat 25 mM, Glukose-6-P 1 mM, GLDH 150/ug/ml, G-6-PDH 1/ug/ml, Tris 0,1 M, pH 8,0, 5'ADP 0,3 mM, BSA 0,02%), in PE-Röhrchen unter Eiskühlung, einpipettiert. Das Cycling lief 60 min lang bei einer 37°C-Inkubation ab und wurde durch eine Inkubation von 2 min bei 100°C abgebrochen. Nach Eiskühlung wurden die Röhrchen 2 min lang zentrifugiert.

1.7.5. Indikator-Reaktion

Zum Cycling-Inkubat wurden unter Kühlung je 200/ul Reagens IV (für Indikator-Reaktion: NADP 0,1 mM, 6PGDH 100/ug/ml, Tris 0,02 M, pH 8,0, $MgCl_2$ 3,25 mM, EDTA 0,1 mM, Ammoniumazetat 64 mM) zugegeben. Die Inkubation dauerte 30 min bei 37°C.

1.7.6. Messung und Berechnung

Die Messung erfolgte in einem Farrand-Fluorimeter bei einer Primärstrahlung von 365 nm und einer Sekundärstrahlung von 480 nm. Als Bezugspunkt wurden Reagentien-

Proben und eine Phosphat-Standard-Verdünnungsreihe durch den Versuch mitgeführt. Letztere hatte bekannte Ausgangskonzentrationen (im Bereich von $10\text{-}50 \cdot 10^{-11}$ Mol/µl), die in einer parallelen photometrischen Messung kontrolliert wurden. Dies lieferte eine Eichkurve für den betreffenden Versuchsansatz und damit die Grundlage für die Berechnung.

Die Enzymaktivität wurde als Mol abgespaltenes P_i pro kg Gewebstrockengewicht und pro Stunde Inkubationszeit der ATPasė-Reaktion ausgedrückt und nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Enzym-Aktivität (MKH)} = \frac{\text{St.-konz.(Mol/l)} \cdot \Delta\text{Proben-f} \cdot \text{Pip.-vol.(l)}}{\Delta\text{St.-f} \cdot \text{Probengewicht(kg)} \cdot \text{Inkub.-Zeit(h)}}$$

St.: Standard
f: Fluoreszenz-Meßwert
Δ: Differenz aus Testwert minus Leerwert
Pipettenvolumen: 201 nl
Inkubationszeit: 10 min

Die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase ergab sich als Differenz der Aktivitätswerte von Total-ATPase minus ouabain-insensitiver ATPase ("Mg^{2+}-ATPase") der korrespondierenden Tubulusanteile.

2. Statistische Auswertung

Voraussetzung der statistischen Auswertbarkeit ist die von vornherein im Versuch festgelegte Paarbildung korrespondierender Tubulusanteile, deren Differenz ihres Total- und Mg^{2+}-ATPase-Wertes den Einzelmeßwert der NaKATPase ergibt. Willkürliche Differenzbildung wird ausgeschlossen.

Zur Überprüfung einiger Extremwerte der Meßwerte von Total- und Mg^{2+}-ATPase wurde deren Zugehörigkeit zur

Stichprobe mit dem Ausreißertest nach Dixon statistisch ermittelt (46). Dabei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit auf $\alpha = 0{,}01$ entsprechend 1% als Kriterium festgesetzt.

Die Signifikanzprüfung für die Na^+-K^+-ATPase-Werte, d.h. der Vergleich der Stichproben hinsichtlich der Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Grundgesamtheit oder zu verschiedenen Grundgesamtheiten, wurde mit dem U-Test (nach Man und Whitney) vorgenommen (46).

Der U-Test bot sich aus zwei Gründen an: erstens brauchen als Voraussetzung für seine Anwendung die Stichprobenwerte nicht normalverteilt zu sein; zweitens genügen für die Herstellung der Prüfgröße U Daten, die auf einer Ordinatsskala liegen (Rangwerte).

Zu 1): Bei den vorliegenden Meßwerten kann nicht sicher auf eine Normalverteilung geschlossen werden. Wegen des geringen Stichprobenumfangs ($6 \leq n \leq 13$) wäre die Normalverteilung im einzelnen nur mit dem Chi-Quadrat-Test zu verifizieren, dessen positiver Ausfall jedoch nicht zu erwarten ist. - Der U-Test ist, wie von der Normalverteilung der Stichprobe, auch von Mittelwert und Standardabweichung unabhängig. Der Übersichtlichkeit wegen sind diese beiden Werte für jede Gruppe angegeben, obwohl sie für die Signifikanzprüfung ohne Belang sind.

Zu 2): Für die Berechnung der Prüfgröße U werden nicht die absoluten Werte aus den Stichproben (der Na^+-K^+-ATPase), sondern ihnen zugeordnete Rangwerte verwendet, die gegen additive Konstanten invariant sind. Die Werte der Na^+-K^+-ATPase stellen ja keine eigentlich experimentell gewonnenen Meßwerte, sondern nur die Differenz solcher Meßwerte dar. Die Rohwerte selbst, d.h. die ursprünglichen Meßwerte von Total- und Mg^{2+}-ATPase, gehen in die statistische Berechnung nicht ein. Additive Konstanten, die diese Rohwerte vor der Differenzbildung verändern, haben also keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Na^+-K^+-ATPase und auf ihren statistischen Vergleich. Da die Rangwerte jedoch gemäß der Eigenart des U-Tests von solchen Konstanten auf jeden Fall unbeeinflußt bleiben, kann so durch sie kein Fehler in der statistischen Auswertung entstehen.

Als Kriterium (vorgegebene Signifikanzgrenze) wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit auf $\alpha = 0{,}05$ entsprechend

5% festgesetzt. In der Signifikanzprüfung wurde die errechnete Prüfgröße U mit dem durch α und die Freiheitsgrade ($m + n - 2$, wobei m und n den Umfang der beiden verglichenen Stichproben bezeichnen) festgelegten kritischen Wert ν verglichen. War $U \leq \nu_{(m,n,\alpha)}$, so galt der Unterschied der beiden Stichproben als signifikant.

3. Bezugsquellen

Actinomycin D: Serva GmbH+Co, Heidelberg; Aldosteron: Aldocorten, Ciba AG, Wehr/Baden; Quabain: Strophantinum G, Sandoz AG, Nürnberg; Phosphorylase a, Glykogen, Rinderserumalbumin: Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; alle andern Enzyme und Substrate: Boehringer GmbH, Mannheim.

ERGEBNISSE

Die gewonnenen Enzymaktivitätswerte von Total-, Mg^{2+}- und Na^{+}-K^{+}-ATPase aus PTC und DTI bei den 5 Gruppen verschieden vorbehandelter Ratten und die Signifikanzprüfungen sind in den Zahlentabellen (S.40) aufgeführt. Die Mittelwerte sind in Tab.I zusammengefaßt.

Die Normalwerte von Total-, Mg^{2+}- und Na^{+}-K^{+}-ATPase des DTI lagen etwa doppelt so hoch wie die des PTC.

Mit Actinomycin D behandelte gesunde Tiere zeigten im DTI unveränderte Enzymaktivitätswerte, zwischen den beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Das leichte Absinken der Werte im PTC erwies sich als nicht signifikant. Die Stichproben aus beiden Tiergruppen gehörten also jeweils derselben Grundgesamtheit an.

Bei den adrenalektomierten Tieren ergab sich für die Aktivität der Na^{+}-K^{+}-ATPase im PTC ein negativer Wert, sie war hier als erloschen anzusehen. Im DTI sank die Aktivität auf ca. 60% des Normalwerts. Der Unterschied zwischen den PTC-Stichproben der gesunden und der adrenalektomierten Tiere wurde als signifikant nachgewiesen. Ein solcher Nachweis ließ sich für die DTI-Stichproben dieser Tiergruppen in der vorliegenden Arbeit nicht führen. Die Ursachen dafür lagen in der starken Streuung der Einzelwerte beider Stichproben gekoppelt mit geringem Stichprobenumfang (n = 8 in beiden Gruppen; vgl. auch S.18). Erweiterung des Stichprobenumfangs hätte zweifellos den Nachweis eines signifikanten Unterschieds ermöglicht, denn in vorangegangenen Arbeiten mit derselben Methode ist dieser Nachweis mehrfach erbracht worden (52, 54, 55).

Tab.I: Aktivitätswerte der Total-, Mg^{2+}-, und Na^{+}-K^{+}-ATPase in MKH (Mittelwert und Standardabweichung, vgl. Zahlentabellen S.40). n: Stichprobenumfang, N: Normaltier (nicht adrenalektomierte Ratte), Ax: Adrenalektomie, Ac: Actinomycingabe, Al: Aldosterongabe.

	n	Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
PTC				
N	8	5,42 ± 1,03	3,91 ± 1,03	1,51 ± 1,40
N+Ac	10	4,42 ± 0,99	3,50 ± 0,88	0,92 ± 1,19
Ax	7	4,78 ± 1,20	5,17 ± 0,63	-0,38 ± 1,26
Ax+Al	13	6,00 ± 1,05	4,29 ± 0,69	1,71 ± 1,26
Ax+Ac+Al	13	5,79 ± 1,40	3,88 ± 0,96	1,91 ± 1,20
DTI				
N	8	11,11 ± 2,43	7,94 ± 1,22	3,18 ± 2,52
N+Ac	6	11,66 ± 2,91	8,14 ± 1,02	3,51 ± 2,93
Ax	8	10,73 ± 1,27	8,76 ± 2,43	1,97 ± 3,22
Ax+Al	9	10,97 ± 1,62	6,08 ± 1,75	4,89 ± 2,06
Ax+Ac+Al	10	9,44 ± 1,59	6,96 ± 1,43	2,48 ± 1,14

Substitution von Aldosteron bei adrenalektomierten Tieren hatte 60-90 min später einen Anstieg der Na^{+}-K^{+}-ATPase auf etwa 110% des Normalwerts im PTC und auf etwa 150% im DTI zur Folge. Dieser Anstieg war gegenüber den adrenalektomierten Tieren für beide Strukturen signifikant.

Die Gabe von Actinomycin D 45 min vor Aldosteronsubstitution ließ die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase im DTI wieder auf ca. 80% des Normalwerts abfallen. Der Aktivitätswert lag damit nur gering über dem der unbehandelten adrenalektomierten Tiere. Dieser Abfall war signifikant. Im PTC dagegen trat kein solcher Abfall ein, die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase lag hier in gleicher Höhe wie nach Aldosteronsubstitution. Zwischen den beiden Stichproben bestand kein signifikanter Unterschied, sie gehörten offenbar derselben Grundgesamtheit an.

Die Aktivität der Mg^{2+}-ATPase lag sowohl für PTC wie für DTI in allen Tiergruppen etwa gleich hoch. Lediglich im PTC der nicht weiter behandelten adrenalektomierten Tiere stieg sie gegenüber dem Normalwert an; im DTI der beiden aldosteronsubstituierten Gruppen sank sie ab. Festgehalten werden kann aber, daß Adrenalektomie oder Gabe von Actinomycin D sie nicht absinken, Gabe von Aldosteron sie nicht ansteigen ließ.

Zusammengefaßt liegt als Ergebnis vor:

- Actinomycin D verändert die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität des gesunden Tiers nicht.
- Adrenalektomie hat ein Absinken der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität auf etwa 60% des Normalwerts im DTI und ihr Erlöschen im PTC zur Folge.
- Behandlung mit Aldosteron führt bei adrenalektomierten Tieren nach 60-90 min zu einem Anstieg der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität, im PTC auf ca 110%, im DTI auf ca. 150% des Normalwerts.
- Suppression dieser aldosteronabhängigen Stimulation durch Actinomycin D tritt nur im DTI ein. Im PTC bleibt ein Suppressionseffekt aus.

DISKUSSION

1. Diskussion der vorliegenden Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob Aldosteron das Transportenzym Na^+-K^+-ATPase über den Weg der DNA-abhängigen RNA-Synthese stimuliert, ob also der Enzymeffekt des Hormons die Transcription von Geninformation voraussetzt. Bekannt ist, daß die Aldosteronwirkung auf den Na^+-Transport der Säugetierniere den intakten Ablauf der Induktion eines Proteins erfordert (s. S.20ff). Wenn die Annahme zutrifft, daß die Na^+-K^+-ATPase in die Aldosteronregulation des Na^+-Transports eingeschaltet ist, muß sie ebenfalls unter dem Einfluß dieser Proteininduktion stehen.

Für den Versuch einer Antwort sollen die vorliegenden Ergebnisse zunächst auf ihre Aussagefähigkeit hin betrachtet werden.

Die Na^+-K^+-ATPase weist, gemäß früheren Untersuchungen mit derselben Methode (Arbeitsgruppe Schmidt - Dubach), bei gesunden Ratten im DTI eine 5-8fach höhere Aktivität auf als im PTC (49). Nach Adrenalektomie sinkt sie in beiden Strukturen ab (52). Aldosteron, in einer einmaligen physiologischen Dosis, normalisiert die erniedrigte Aktivität innerhalb von 90 min partiell (48, 54), nach neueren Befunden innerhalb von 60 min vollständig (53, 55). Diese Zeitspanne entspricht der charakteristischen Latenzzeit der Aldosteronwirkung auf den Na^+-Transport (s.S.21). Die verwendete Aldosterondosis von 5-6 µg/100 g Körpergewicht ist geeignet, 90% der Maximalwirkung auf die Elektrolytausscheidung an der adrenalektomierten Ratte hervorzurufen (25). Sie entspricht etwa der

2-3fachen endogenen 24-Stunden-Sekretion der Ratte (bei 63) und ist etwas kleiner als die Dosis, mit der bei Mikropunktionsversuchen eine Normalisierung der nach Adrenalektomie gesenkten lokalen Na^+-Transportrate erreicht wird (7,5 µg/100 g täglich über mehrere Tage) (63).

Die Messungen der vorliegenden Arbeit bestätigen die Normalisierung der bei adrenalektomierten Tieren erniedrigten Na^+-K^+-ATPase 60-90 min nach einer in vivo-Gabe von 6 µg/100 g Aldosteron. Im DTI geht die Wirkung noch darüber hinaus. Die Aktivitätswerte von Normaltieren dagegen liegen hier, abweichend von früheren Untersuchungen (s.o.), im DTI nur etwa doppelt so hoch wie im PTC. Als Ursache können Dissektionsfehler vermutet werden. Ein Tubulusquerschnitt des aktivitätsreicheren DTI wiegt wegen des Fehlens von Bürstensaum weniger als ein Querschnitt des proximalen Tubulus bei gleicher Länge (der Schnittdicke von 16 µm). So resultiert bei der gewählten Bezugsgröße Gewicht in der Messung des DTI eine verhältnismäßig hohe Aktivität. Diese kann erheblich reduziert werden, wenn bei nicht ganz exakter Dissektion kleine Anteile andersartiger, aktivitätsarmer, aber relativ schwerer Tubuli anhängen. Solche Fehler erklären auch die hohe Streuung der DTI-Werte (s.S.14 u. Tab.I).

Methodische Faktoren eher grundsätzlicher Art dagegen sind möglicherweise die Ursache dafür, daß im PTC ein meßbarer Suppressionseffekt von Actinomycin D auf die Aldosteronwirkung im adrenalektomierten Tier ausbleibt. Im PTC sind die absoluten Aktivitätswerte der Na^+-K^+-ATPase so klein, daß schon ihr Unterschied von Null nur schwer nachweisbar sein kann. Tatsächlich vorhandene Unterschiede zwischen verschiedenen Stichproben, ent-

sprechend noch kleiner, können daher der meßtechnischen und statistischen Erfassung leicht entgehen, zumal bei geringem Stichprobenumfang wie in der vorliegenden Arbeit. Es besteht also die Möglichkeit, daß sich die PTC-Enzymaktivitäten der beiden fraglichen Tiergruppen zwar unterscheiden, der Unterschied aber aus den geschilderten prinzipiell-methodischen Gründen nicht zu erfassen ist.

Diese Vermutung wird gestützt durch Befunde aus Parallelversuchen, bei Anwendung derselben Methode, mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid, der in den nächstfolgenden Schritt der Induktion, die Translation, eingreift. Dabei tritt eine Suppression der Aldosteronwirkung nicht nur im DTI, sondern auch im PTC ein (48, 54, 55). Ein Beweis wäre jedoch erst mit der Erweiterung der Actinomycin-Experimente auf einen wesentlich größeren Stichprobenumfang zu erbringen.

Die vorliegenden Ergebnisse müssen also im Licht von methodischen Einschränkungen betrachtet werden. Dies betrifft allgemein die Bewertung naturwissenschaftlich-experimentell gewonnener Aussagen: die Art der möglichen Antwort hängt von der Art der Fragestellung und dem methodischen Zugangsweg ab. Der Vorzug der hier verwendeten Methode liegt zuerst in ihrer hohen Ortsspezifität. Gerade heterogene Organe wie die Niere verlangen die gezielte Untersuchung einzelner Strukturen. Der zweite Vorzug ergibt sich aus der Art der Gewebebehandlung. Biochemische Analysen müssen zwar in vitro stattfinden, ihre Bedingungen aber sollen denen in vivo weitgehend angenähert sein, damit das Untersuchungsobjekt, hier das Enzym, nicht wesentliche Eigenschaften verliert. Die Enzymaktivität wird mit der hier angewendeten

Methode in der intakten Zelle in situ und in nahezu nativem Zustand untersucht. Dieser Zustand bleibt durch Lyophilisieren und Verwendung der natürlichen Ionen- und Substratkonzentrationen sowie durch Vermeidung fixierender und denaturierender Agentien fast völlig erhalten. So werden nachweislich auch hochempfindliche, labile Enzyme wie die Phosphofructokinase geschont (47).

Zur Beantwortung der eingangs gestellten Frage kann festgehalten werden: Die Aldosteronwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase im DTI wird durch den RNA-Synthesehemmer Actinomycin D verhindert. Sie ist folglich vom intakten Ablauf der RNA-Synthese an der DNA-Matrize des Zellkerns abhängig und verläuft also, wie die Wirkung auf den Na^+-Transport, wahrscheinlich über die Induktion eines Proteins. Für den PTC kann die Frage allein aufgrund der vorliegenden Arbeit wegen methodischer Einschränkungen weder positiv noch negativ beantwortet werden.
Damit ist ein weiteres Argument dafür gewonnen, daß die Aldosteronsteuerung des Na^+-Transports am Transportenzym, der Na^+-K^+-ATPase, angreift. Wie sich dieses Argument in die Kenntnisse von der Aldosteronwirkung auf den renalen Na^+-Transport einordnet, soll im folgenden dargestellt werden.

2. Induktionshypothese

Die Induktion von Proteinen stellt eine der Möglichkeiten für die Wirkungsweise von Hormonen dar. Daß Aldosteron den aktiven Na^+-Transport über Induktion beeinflußt, gilt als weitgehend gesichert. Umstritten ist dagegen die Funktion des aldosteron-induzierten Proteins

(AIP) bei der Steuerung des Na^+-Transports, also der Mechanismus jenseits der Induktion (s.S.27ff).

Die Niere resorbiert zwei Drittel des glomerulär filtrierten Na^+ bereits im proximalen Konvolut. Davon beansprucht nur die Hälfte den Weg des aktiven Transports: die Pumpe, in der peritubulären Zellmembran lokalisiert (30, 31), reichert Na^+ im interzellulären Spaltensystem des basalen Labyrinths an; lokale Osmose sorgt für passives Nachströmen der anderen Hälfte samt Wasser und weiteren Ionen (Modell der isosmotischen Resorption) (13, 29). Im Gegensatz zur isotonen proximalen Resorption muß das verbleibende Drittel (20% entfallen auf den aufsteigenden Teil der Henle'Schleife, die restlichen 10% auf distales Konvolut und Sammelrohr) aktiv gegen einen hohen Konzentrationsgradienten, bei fehlender oder geringer Wasserpermeabilität, resorbiert werden (13, 29).

Aldosteron erhöht die Na^+-Resorption der Niere sowie die Sekretion von K^+- und H^+-Ionen, was nicht direkt miteinander gekoppelt ist (12, 13, 43); letzteres ist unabhängig von der Induktion (1, 9, 39, 64). Die Na^+-retinierende Wirkung betrifft vor allem den distalen Tubulus, aber auch im proximalen Konvolut wird Na^+ unter Wahrung der Isotonie vermehrt resorbiert (15, 63).

2.1. Latenzzeit

Die Induktionshypothese für die Aldosteronwirkung auf den Na^+-Transport wurde am in vitro-Modell der Krötenblase aufgestellt. Den Anlaß dazu gab die Beobachtung einer Latenzzeit zwischen Aldosteronzusatz und -effekt von 60-90 min Dauer; erste Belege lieferte der Nachweis der wesentlichen Schritte der Induktion, nämlich Aldosteronbindung im Zellkern und Notwendigkeit von intakter RNA- und Proteinsynthese (7). Der Ablauf der Latenzzeit hat eine feste Zeitfolge: Aldosteron wird innerhalb von 15 min in den Zellkern aufgenommen, danach spielt die Anwesenheit des Aldosterons keine Rolle mehr. Die DNA-abhängige RNA-Synthese geht der Protein-

synthese voraus. Diese findet erst in den letzten 15 min der Latenzzeit statt, wobei die bis dahin angesammelte RNA gleichzeitig umgesetzt wird ("koordinierte Translation") (32). Aldosteron greift ausschließlich bei der Transcription ein. Es beeinflußt weder direkt die Translation noch die Lebensdauer (Zerfallsrate) von RNA- und Proteinmolekülen (32).

Auch an der Säugetierniere zeigt sich der Aldosteroneffekt erst nach Verstreichen einer Latenzzeit. Die Elektrolytwirkung beginnt nach 45-60 min (12, 41, 43, 63) und erreicht ihr Maximum nach 4 h (25), wenn Aldosteron schon größtenteils abgebaut ist (biologische Halbwertszeit 30-40 min (12)). Erhöhte Aktivität der Na^+-K^+-ATPase kann nach 60-90 min gemessen werden (s. S.17).

Bei Applikation eines Hormons am Gesamtorganismus ist, besonders bei Steroidhormonen, das Problem der Verteilung und Ankunft am Zielorgan zu berücksichtigen. Aber auch nach direkter Injektion in die Nierenarterie ist die Latenzzeit der Elektrolytwirkung nicht kürzer als 40 min (bei 12). Der maximale Plasmaspiegel von Aldosteron wird bei subcutaner Injektion nach 30 min erreicht (9), bei der hier verwendeten intraperitonealen Injektion demnach früher. Er fällt zeitlich mit der maximalen Bindung an den cytoplasmatischen Receptor zusammen (beides innerhalb 2 min nach intravenöser Injektion); das Maximum der nucleären Bindung tritt 10 min nach i.v.-Injektion ein (42).

2.2. Receptoren

Die Bindung von Aldosteron an spezifische cytoplasmatische Receptoren (Proteine) leitet den Induktionsvorgang ein. Der entstandene Aldosteron-Receptor-Komplex

wird in den Kern übergeführt und dabei in seine nucleäre Form umgewandelt, die dann an den DNA-Anteil von Chromatin gebunden wird (8, 42). Es gibt zwei Typen von Aldosteronreceptoren, Typ I stellt den mineralocorticoiden, Typ II den glucocorticoiden dar (10). Spironolacton blockiert spezifisch den Typ I-Receptor und eignet sich somit dazu, Aldosteroneffekte auf ihre mineralocorticoide Spezifität zu prüfen. Ein Nachweis dieser Art wurde auch für die Wirkung auf die Na^+-K^+-ATPase der Ratten- und Kaninchenniere geführt (2, 18, 53).

Die Receptorverteilung bestimmt den Ort der Aldosteronwirkung. Denn aktiver Na^+-Transport findet in jeder Körperzelle statt, die Hormonregulation kann aber nur dort angreifen, wo Receptoren vorhanden sind. Bei der Ratte sind Typ I-Receptoren in äußerem Cortex und Medulla-Papilla von Nierenschnitten in gleichem Ausmaß vertreten (10). Nach Untersuchungen von tubulären Suspensionen aus dem Cortex, mit Anreicherung distaler bzw. proximaler Strukturen, haben distale eine 9fach höhere Receptormenge (56).

Beim Kaninchen sind die Befunde zum Ort der Mineralocorticoidwirkung höchst widersprüchlich. In Nierenschnitten wird Aldosteron nur in Cortex und äusserem Mark gebunden, bei Untersuchungen mikrodissezierter Tubuli (mit Kollagenase, s.u.) nur in Verbindungsstück, corticalem und medullärem Sammelrohr (5). Der aktive Kationentransport dagegen wird ausschließlich im corticalen Sammelrohr beeinflußt (58). Die Na^+-K^+-ATPase wird, nach Untersuchungen mit der auch hier verwendeten Mikrodissektionsmethode bei Aldosterongabe in vitro, außer im corticalen Sammelrohr auch im corticalen Teil der aufsteigenden Henle'Schleife stimuliert (18), nach anderen Autoren mit dem in-vitro-Ansatz (mit Kollagenase) nicht beeinflußt (4), sondern erst nach chronischer Verabreichung von Mineralocorticoid in vivo stimuliert (11), und auch dann nur im corticalen Sammelrohr und im Verbindungsstück.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Na^+-K^+-ATPase-Untersuchungen könnten mit methodischen Unterschieden erklärt werden. Die beiden zuletzt zitierten Arbeiten (4, 11), wie auch die Receptoruntersuchung am Kaninchen (5, s.o.), benutzen zur Tubuluspräparation Kollagenase, eine Protease, die möglicherweise den äußerst labilen und für Proteasen anfälligen cytoplasmatischen Receptor (42) angreifen könnte. Außerdem werden die Tubuli bei der Vorbereitung der Na^+-K^+-ATPase-Messung einem "osmotischen und Temperatur-Schock" ausgesetzt, der in der Zelle mit Wassereinstrom und Eiskristallbildung einhergehen dürfte und auf jeden Fall weniger schonend ist als die, auch hier verwendete, Methode der zuerst zitierten Arbeit (18, vgl. S.5 und S.19).

An der Ratte ist jedenfalls, im Gegensatz zum Kaninchen, der medulläre Angriffspunkt von Aldosteron vielfach belegt. Neben der erwähnten Receptoruntersuchung (10, s.o.) sind anzuführen: Einfluß auf den Na^+-Transport in der Henle'Schleife (63), auf die Na^+-K^+-ATPase in der äußeren Markfraktion (2, 14, 21) bzw. im mikrodissezierten DTI (48, 54, 55, hier bestätigt), sowie auf die Proteinsynthese (24, 35) und die Citratsynthase (36) in der Medulla. Außerdem ist auch der PTC der Ratte, anders als der des Kaninchens, als Ort der Aldosteronwirkung ausgewiesen, sowohl für den Na^+-Transport (15, 63) als auch für die Na^+-K^+-ATPase (48, 54, 55, und hier). Eine segmentbezogene Bestimmung der Receptoren an der Rattenniere fehlt bisher.

2.3. RNA-Synthese

Auf noch unbekannte Art führt die Aldosteronbindung im Kern dann zur Synthese von RNA an der DNA-Matrize. Die RNA-Menge und der Einbau von markierten Vorstufen (z.B. Uridin) in RNA der Nieren adrenalektomierter Ratten steigen nach Aldosteron (1, 9). An der Krötenblase ließ sich nachweisen, daß es sich dabei um mRNA handelt (45).

Werden Aldosteroneffekte von Actinomycin D aufgehoben, so können sie als abhängig von der intakten RNA-Synthese

gelten. An adrenalektomierten Ratten und Hunden bleibt nach Gabe von Actinomycin D die sonst von Aldosteron hervorgerufene Na^+-Retention aus (1, 9, 39, 64), wobei zeitliche Korrelation mit der Hemmung der RNA-Synthese besteht (1, 64). Actinomycin D erniedrigt die lokale Na^+-Transportrate in Mikropunktionsversuchen von gesunden und aldosteronsubstituierten adrenalektomierten Ratten auf Adrenalektomie-Niveau (61). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Actinomycin D die Aldosteronstimulation der Na^+-K^+-ATPase in DTI verhindert.

Actinomycin D blockiert den Transcriptionsvorgang durch Intercalation, Einlagerung in den DNA-Doppelstrang an Guanin. Das verhindert die Ablesung der DNA-Matrize und damit die Synthese von RNA. Auch der Akzeptorvorgang von Aldosteron an DNA wird beeinträchtigt (8). Actinomycin D greift (ähnlich wie Aldosteron, s.S.22) sonst nirgends in der Zelle ein, behindert also bereits eingetretene Aldosteronwirkungen jenseits der Transcription nicht (z.B. als Transportgift)(32).

Die Transcription allerdings blockiert es generell: die gesamte DNA-abhängige RNA-Synthese der Zelle, nicht nur spezifisch die aldosteronbedingte, wird unterbrochen und dadurch die Proteinsynthese in einem breiten Bereich lahmgelegt (35). Dies betrifft in erster Linie neu induzierte Proteine, bei Aldosteroneinwirkung also das AIP. Aber auch unabhängig von Induktionseinflüssen werden in der Folge Proteine ausfallen, und zwar zuerst die kurzlebigen, deren Bestand in der Zelle auf fortlaufenden Nachschub angewiesen ist. Die Na^+-K^+-ATPase selbst, mit langer Lebensdauer bei niedrigem "turnover" (6), gehört zwar nicht dazu. Falls sich aber unter den in kurzer Zeit ausbleibenden Proteinen eines befände, das für die Funktion der Na^+-K^+-ATPase (z.B. für ihre

Konformation) wesentlich wäre, so könnte Actinomycin D die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase indirekt, d.h. nicht durch Blockierung der Aldosteronwirkung, beeinträchtigen. Die Hemmung der Na^+-K^+-ATPase nach Actinomycin D hätte in diesem Fall nichts mit dem Aldosteroneinfluß auf das Enzym zu tun.

Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch die Tatsache, daß bei den gesunden Tieren der vorliegenden Untersuchung innerhalb von 105-135 min nach Actinomycin D keine Hemmung der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität eintritt. Die lokale Na^+-Transportrate gesunder Ratten dagegen wird, allerdings mit der doppelten der hier verwendeten Dosis (200 µg/100 g), innerhalb von 90-120 min auf Adrenalektomie-Niveau gesenkt (61). Da Actinomycin D an mehrtägig mit Aldosteron substituierten adrenalektomierten Ratten denselben Effekt hat, wurde dies von den Autoren als spezifische Hemmung nur des aldosteron-abhängigen Anteils des Na^+-Transports aufgefaßt (61). Bestätigt wird diese Auffassung dadurch, daß alleinige Actinomycin D-Gabe am adrenalektomierten Tier den Na^+-Transport nicht weiter beeinträchtigt (1, 39, 61, 64). Eine unspezifische, d.h. vom Aldosteroneinfluß unabhängige Reduktion der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität durch Actinomycin D ist demnach wenig wahrscheinlich.

2.4. Proteinsynthese

Die unter Aldosteroneinfluß gebildete RNA dient in den Ribosomen als Vorlage zur Synthese des AIP. Gesteigerte Proteinsynthese nach Aldosteron ist durch vermehrten Einbau markierter Aminosäuren in Nieren adrenalektomierter Ratten nachgewiesen (9, 24, 28, 35). Nach Untersuchungen mit in vitro zugesetzten Aminosäuren werden mehrere Proteine der Medulla induziert. Betroffen sind

alle Zellfraktionen mit Ausnahme der Kernfraktion (35). In der Cytosolfraktion läßt sich (mindestens) ein AIP mit Molgewicht 31 000 nachweisen (35), in der Mitochondrienfraktion (mindestens) zwei AIP, wovon eines mit der Citratsynthase identisch sein könnte (36). (Die Zellmembranfraktion, Sitz der Na^+-K^+-ATPase, wurde von den Autoren nicht näher untersucht.) Dagegen erhöht Aldosteron den Einbau in vivo zugeführter Aminosäuren ausschließlich in der schweren Mikrosomenfraktion; das entstehende AIP hat ein Molgewicht von 100 000 und läßt sich direkt als Na^+-K^+-ATPase identifizieren (28). In der Bürstensaumfraktion werden unter Aldosteroneinfluß die markierten Aminosäuren für kurze Zeit in 6 Proteinen vermehrt wiedergefunden (24), deren Bedeutung aber unklar ist (fraglicher Zusammenhang mit der Permeabilität, s.S.29).

Entsprechend der Notwendigkeit intakter Proteinsynthese kann die Aldosteronwirkung auch mit Proteinsynthesehemmern blockiert werden. Cycloheximid, das durch Bindung an Ribosomen die Verlängerung der entstehenden Polypeptidketten hemmt, unterdrückt die Aldosteronstimulation der Na^+-K^+-ATPase im proximalen und distalen Konvolut sowie im aufsteigenden Teil der Henle'Schleife (48, 54, 55).

3. Funktion des AIP

Für die Funktion des AIP gibt es mehrere hypothetische Möglichkeiten, die in der Literatur als "Permeasetheorie", "Energietheorie" und "Pumptheorie" zusammengefaßt werden. Damit soll erklärt werden, wie das Induktionsprodukt die Aldosteronsteuerung auf den aktiven Na^+-Transport ver-

mittelt, wie also der physiologische Effekt - das Ziel der Hormonregulation - zustande kommt. Entsprechend wurde versucht, das AIP als "Permease" (24), als Schlüsselenzym des Energiestoffwechsels (36) oder als Pumpe bzw. deren Bestandteil (28) zu identifizieren (s.S.27).

Na^+ tritt an der luminalen Seite passiv, dem Konzentrationsgradienten folgend, in die Tubuluszelle ein und wird an der basolateralen Zellmembran aktiv, unter Energieverbrauch zur Überwindung des elektrochemischen Gradienten, von der Pumpe ausgestoßen (13, 37, 44). Die Regulation dieses Na^+-Flusses kann nur an einer von der Zelle beeinflußten Schaltstelle ansetzen: an der Pumpleistung. Sie wird von zwei Faktoren bestimmt: erstens von der Menge an Pumpenzymmolekülen und zweitens von deren Aktivität. Entsprechend läßt sich die Pumpleistung regulieren: erstens über Beeinflussung von Synthese oder Abbau des Enzyms, zweitens über die Modifizierung der Aktivität vorhandener Enzymmoleküle. Zum Zweck der Modifizierung können die Affinitätseigenschaften des Enzyms verändert werden, oder es können (im Fall der Aktivitätssteigerung) latente Enzymmoleküle in aktive umgewandelt werden (z.B. durch Konformationsänderung, Entfernung eines Repressors, Umwandlung von Proenzym in Enzym). Diese Möglichkeiten betreffen alle primär das Pumpenzym und werden als "Pumptherorie" zusammengefaßt.

Die Modifizierung der Enzymaktivität kann aber auch primär über das Substrat verlaufen: Änderung der Substratkonzentration unterhalb des Sättigungsbereichs ändert die Enzymaktivität aus Gründen des Angebots (Michaelis-Menten-Kinetik). Das Substrat, das für die Pumpe verfügbar sein muß, ist zum einen ATP, der Energieträger, zum andern Na^+, das Transportobjekt. "Energietheorie" und "Permeasetheorie" nehmen damit eine sekundäre Beeinflussung der Pumpe an.

3.1. Permeasetheorie

Die "Permeasetheorie" postuliert eine Regulation über die Permeabilität der luminalen Zellmembran. Wird die Permeabilität erhöht, so folgt mehr Na^+ dem Gradienten, die intrazelluläre Na^+-Konzentration steigt, und die Pumptätigkeit wird entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik beschleunigt.

Die Hypothese fußt auf Beobachtungen am Krötenblasenepithel, wo der Na^+-Eintritt einem Sättigungsmechanismus unterliegt und der intrazelluläre Na^+-Pool nach Aldosteron ansteigt (37). Eine wie auch immer geartete Permease wurde nie nachgewiesen; weitere Befunde sind höchst widersprüchlich (s. bei 8 und 44).

Am Säugetier jedenfalls senkt Aldosteron die nach Adrenalektomie angestiegene intrazelluläre Na^+-Konzentration, was für die primäre Beeinflussung der Na^+-Ausstoßung spricht. Nach Mikropunktionsbefunden soll Aldosteron die Permeabilität unabhängig von der Induktion erhöhen (62). Die von Aldosteron hervorgerufenen Veränderungen in der Bürstensaumfraktion der Niere - erhöhter turnover der Lipidkomponente (26) bei gesteigerter Lipidsynthese (27) und erhöhter Aminosäureneinbau (24, s.S.27) - wurden von den Autoren als mögliche biochemische Grundlage für erhöhte Permeabilität interpretiert.

3.2. Energietheorie

Der "Energietheorie" zufolge soll Aldosteron die Lieferung von ATP aus den Mitochondrien regulieren. Das ATP-Angebot bestimmt die Pumpleistung wegen der Substratabhängigkeit der Enzymaktivität (7, 44).

Im Energiestoffwechsel der Rattenniere treten nach Aldosteron folgende Veränderungen ein: Die Aktivität einiger mitochondrialer Enzyme steigt an; im Citronensäurecyclus sind dies u.a. die Citratsynthase (23, 25, 36, 40, 41) und die (cytoplasmatische) NADP-Isocitratdehydrogenase (23, 40, 41), in der Atmungskette verschiedene Cytochrome (40, 41). Außerdem steigt die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase der Glykolyse (23). Einige andere Enzyme derselben Stoffwechselwege werden dagegen nicht beeinflußt (23, 40, 41). Der Redoxstatus der Mitochondrien wird in Richtung der reduzierten Metabolite verschoben, also mehr NADH-Wasserstoff für die ATP-Produktion in der Atmungskette bereitgestellt (25). Die Verbrennung von Succinat steigt, nicht jedoch die anderer Substrate (27).

Die Citratsynthase, der im Citronensäurecyclus eine Schlüsselfunktion (Bestimmung der Durchsatzrate) zukommt, wird von Aldosteron über die mineralocorticoiden Receptoren beeinflußt (25). Einige weitere Befunde sprechen für (36), andere gegen die Induktion dieses Enzyms (40). Über welchen genauen Mechanismus sie die Aldosteronwirkung auf den Na^+-Transport vermitteln könnte, ist nicht bekannt (36).

Gegen die Energietheorie ist einzuwenden: Der Regulationsmechanismus über die ATP-Bereitstellung ist insofern ungezielt, als die meisten energieabhängigen Leistungen der Zelle davon betroffen werden müßten. Die Befunde lassen überdies offen, ob Aldosteron nicht stattdessen primär die Pumpaktivität steigert und die Energielieferung sekundär, über den ATP-Verbrauch, erhöht. Zwar spräche eine Induktion der Citratsynthase, da sie im Zellkern ausgelöst wird, eher für die primäre Regulation des Energiestoffwechsels. Dem steht ein direkter Hinweis für dessen sekundäre Beeinflussung gegenüber: Wenn das Pumpenzym mit Ouabain blockiert wird, steigt die Succinatverbrennung nicht, wie sonst, nach Aldosteron an (27). Die Succinatverbrennung ist also von der Tätigkeit der Pumpe abhängig und nicht umgekehrt.

3.3. Pumptheorie

Die "Pumptheorie" besagt, daß die Aldosteronregulation des Na^+-Transports, vermittelt durch das AIP, direkt am Molekül des Pumpenzyms angreift (zu den verschiedenen Möglichkeiten s.S.28).

Pumpenzym ist die Na^+-K^+-ATPase (57, 60). Zwei Monomere aus je einem katalytischen Protein (Molgewicht 90 - 100 000) und einem Glykoprotein bilden ein Dimer (60). Für ihre Funktion ist außerdem eine organisierte Lipoproteinstruktur der umgebenden Zellmembran notwendig (57, 60). Die Lebensdauer des Enzyms ist lang,

der "turnover" damit niedrig (Halbwertszeit 66-86 h) (6). Für jedes gespaltene ATP transportiert es 3 Na^+-Ionen aus der Zelle heraus und 2 K^+-Ionen hinein (Funktionsmodell s. bei 29, 30, 31, 60; die Ionen-Nettoflüsse resultieren aus Pumpleistung und Leckflüssen der beteiligten Membranen).

Die Lokalisation der Na^+-K^+-ATPase in der Tubuluszelle und ihre Verteilung entlang dem Tubulusapparat entsprechen der resorptiven Funktion der Niere (s.S.21). Lokalisiert in den basolateralen Zellmembranen, in enger Nachbarschaft der Mitochondrien (30, 31, 50), stellt sie die treibende Kraft für die tubuläre Resorption von Na^+-Ionen dar (wovon die Resorption weiterer Substanzen abhängig ist)(13). Dichte und Menge der Na^+-K^+-ATPase sind im distalen Tubulus größer (30, 31) und die spezifische Aktivität 5-8fach höher (49) als im proximalen, dies entspricht dem höheren Energiebedarf der distalen Na^+-Resorption.

Die Pumptheorie wurde zunächst abgelehnt, da Enzymaktivitätsmessungen im Homogenat keine zeitliche Korrelation zwischen den Na^+-K^+-ATPase- und den Elektrolyt-Veränderungen unter Aldosteroneinfluß ergaben (2, 3, 14, 20, 21, 22, 34). Im Nierenhomogenat adrenalektomierter Ratten ist ein Anstieg der Enzymaktivität frühestens 6 h nach Aldosteron nachzuweisen (21). Die Dauer der Latenzzeit ist bezeichnenderweise von der untersuchten Nierenzone abhängig; die kürzeste wird in der äußeren Medulla beobachtet (21), die den höchsten Anteil an aktivitätsreicheren distalen Tubuli hat. Erst bei Reindarstellung der Na^+-K^+-ATPase läßt sich der Aldosteroneffekt schon nach 3 h nachweisen (28). Unter Verzicht auf Detergentien bei der Präparation fanden andere Autoren 1 h nach Aldosterongabe einen Aktivitätsanstieg im Nierenhomogenat von gesunden Ratten, in enger zeitlicher Korrelation zur Veränderung der Elektrolytausscheidung (19). Auch

an der Krötenblase ist die Aldosteronwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase im Homogenat nicht festzustellen (16), dagegen aber mit einer cytochemischen Mikromethode (33).

Die geringe Empfindlichkeit der Homogenatuntersuchungen ist auf zwei Nachteile der Methode zurückzuführen. Zum einen entstehen, bei der Zerstörung der Zellen, Vesikel aus Membranbruchstücken, die mit Detergentien geöffnet werden müssen, damit das Substrat Zutritt zum Enzym erhält (22). Detergentien aber können wegen ihrer lipidlösenden Wirkung die Na^+-K^+-ATPase schädigen, deren Funktion auf eine intakte Lipidumgebung angewiesen ist (s.S.30). Zum andern ist die Methode zu ungezielt, auch wenn die Niere vor dem Homogenisieren in Zonen aufgeteilt wird. Mit jeder Gewebsprobe wird, aufgrund der Heterogenität der Niere, ein anderer proportionaler Anteil verschiedenartiger Tubulusabschnitte erfaßt. Dies führt zu breiten Schwankungen und setzt die Zuverlässigkeit der Aussage und die Reproduzierbarkeit herab (vgl. 2 und 14).

Die hier verwendete Mikrodissektionsmethode vermeidet beide Nachteile (s.S.19f). Bei direkter Gegenüberstellung von Untersuchungen des Homogenats und mikrodissezierter Tubuli läßt sich zeigen, daß trotz unterschiedlicher Enzymaktivitäten der Einzeltubuli verschiedener Tiergruppen im Homogenat kein Unterschied erfaßt werden kann (17), und daß umgekehrt die Schwankungen der Homogenatergebnisse Unterschiede zwischen Tiergruppen vortäuschen können, wo in den Einzeltubuli keine bestehen (47).

Messungen an mikrodissezierten Tubuli machen denn auch deutlich, daß Veränderungen der Na^+-K^+-ATPase unter verschiedenen Bedingungen veränderter Mineralocorticoidspiegel wesentlich früher eintreten, als dies in den meisten Homogenatuntersuchungen zu erkennen ist. Nach den Mikrodissektionsbefunden besteht zeitliche Korrelation zur Mineralocorticoidwirkung auf den Na^+-Transport (Übersicht bei 53). So vermag Aldosteron bei adrenalektomierten Ratten die Na^+-K^+-ATPase innerhalb von 60-90 min zu stimulieren, teilweise bis zum Normalwert (48, 54, 55). Dies wird in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

An Tubuli adrenalektomierter Kaninchen wird sogar bei Aldosteronzusatz in vitro nach 60 min vollständige Normalisierung erreicht (18); dem widersprechen Befunde anderer Autoren (4) (ausführliche Diskussion dazu s. S.23f).

Daß chronische Mineralocorticoidzufuhr die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität erhöht, wurde - im Gegensatz zum Akuteffekt - mit allen angewendeten Untersuchungsmethoden belegt (2, 3, 11, 14, 21, 22, 28, 34). In Verbindungsstück und corticalem Sammelrohr des Kaninchens geht die chronisch stimulierte Enzymaktivität einher mit Epithelverdickung als möglichem Hinweis auf Membranproliferation (38).

Außer der zeitlichen Korrelation besteht Übereinstimmung zwischen Na^+-K^+-ATPase und Na^+-Transport der Niere auch insofern, als beide von Aldosteron über den Weg der Induktion beeinflußt werden. Wie im Abschnitt über die Induktionshypothese dargestellt (s.S.20ff), sind für die Aldosteronwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase alle Schritte der Induktion nötig: Aldosteronbindung an mineralocorticoide Receptoren (2, 18, 53), intakter Ablauf der DNA-abhängigen RNA-Synthese (in der vorliegenden Arbeit für den DTI belegt) und der Proteinsynthese (48, 54, 55). Ein AIP ist als Na^+-K^+-ATPase (katalytische Untereinheit) identifiziert (28).

3.4. Abwägung der dargestellten Möglichkeiten

Die dargestellten Befunde über die Na^+-K^+-ATPase - Verteilungsmuster im Nephron; Aldosteronstimulierung ähnlich dem Na^+-Transport, was zeitlichen Ablauf und den Induktionsweg betrifft - bilden die Grundlage für die These, daß Aldosteron die renale Na^+-Resorption über die Na^+-K^+-ATPase reguliert. Ob dies primär das

Enzymmolekül betrifft oder sekundär über sein Substrat verläuft, läßt sich damit noch nicht entscheiden. Zunächst soll diskutiert werden, welche Möglichkeiten der "Pumptheorie" (s.S.27f) zutreffen könnten.

Eine Erhöhung der Pumpenzym-Menge durch Neusynthese hieße eine direkte Induktion der Na^+-K^+-ATPase selbst. Obwohl schon 3 h nach Aldosterongabe ein AIP als Na^+-K^+-ATPase nachgewiesen wurde (28), ist dies als Mechanismus der Akutsteuerung durch Aldosteron wegen des niedrigen turnovers des Enzyms unwahrscheinlich (6).

> Zwei Überlegungen sollen dies verdeutlichen: Die Produktionseinrichtungen der Zelle sind für das Protein Na^+-K^+-ATPase auf eine kleine Syntheserate eingestellt, die wegen seiner langen Lebensdauer zur Aufrechterhaltung des Zellbestands unter Normalbedingungen genügt. Die zusätzliche Neusynthese einer solch großen Molekülzahl in kurzer Zeit, wie sie der beobachteten Aktivitätssteigerung entspricht, erfordert die Vervielfachung der Syntheserate um einen Faktor, der die Produktionskapazitäten der Zelle weit übersteigt.
>
> Hormonregulation allein über die Erhöhung der Menge langlebiger Enzymmoleküle bedeutet zweitens, daß die Hormonwirkung länger anhält, als es im Interesse der Anpassungsfähigkeit des Organismus an veränderte Gegebenheiten sinnvoll ist. Tatsächlich aber geht der Na^+-Transport an der Krötenblase nach Aldosteronentfernung schneller zurück (Halbwertszeit 6,7 h (32)), und die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität der Rattenniere fällt nach Adrenalektomie im DTI nach 6 h bereits um 65% ab (52). Beide Zeitangaben liegen um den Faktor 10 niedriger als die Halbwertszeit des Enzymmoleküls mit 66-86 h (6).

Aldosteron könnte die Pumpenzym-Menge auch durch Verlangsamung der Abbaurate erhöhen, dies wurde an der Krötenblase ausgeschlossen (32, s.S.22). Die Affinitätseigenschaften der Na^+-K^+-ATPase bleiben unter Aldosteroneinfluß unverändert und scheiden damit als Mittel der Regulation ebenfalls aus (3, 8, 14, 16, 20, 22).

Wenn Aldosteron für die Akutsteuerung des renalen Na^+-Transports über das AIP primär am Pumpenzym angreift, so kann dies also nur dadurch geschehen, daß vorhandene, inaktive Enzymmoleküle in aktive umgewandelt werden. Das AIP könnte für diesen Zweck z.B. ein Na^+-K^+-ATPase-Proenzym zum funktionstüchtigen Enzym vervollständigen, oder einen Repressor vom blockierten Enzymmolekül entfernen. Auch eine Änderung der Konformation durch das AIP ist denkbar, z.B. über Beeinflussung der Lipidkomponente der umgebenden Zellmembran. Tatsächlich gibt es Hinweise für aldosteronbedingte Veränderungen im renalen Lipidstoffwechsel, dessen Auswirkungen aber nur am luminalen, bürstensaumtragenden Teil der Zellmembran (im Hinblick auf die Permeabilität, s.S.29) untersucht wurden (26, 27).

Für die chronische Stimulation des Pumpenzyms dagegen kann dessen Neusynthese angenommen werden. Hinweise für Proliferation der Zellmembran, dem Sitz des Enzyms, machen dies wahrscheinlich (38). Die späte Beobachtung des Aktivitätsanstiegs mit den weniger empfindlichen Methoden (Homogenat, Mikrodissektion mit Kollagenase und "Schockbehandlung", s.S.31f und S.24) wird durch die dann vorliegende höhere Menge an Enzym erklärt.

Es bleibt noch zu erörtern, ob die aldosteronbedingten Veränderungen der Na^+-K^+-ATPase nicht auch sekundär, als Folge einer Regulation über die Substratkonzentration, eintreten könnten. Unterhalb des Sättigungsbereichs variierte Substratkonzentration bestimmt grundsätzlich die aktuelle Enzymaktivität der Zelle (entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik, vgl. S.28), ein solcher Aldosteroneinfluß könnte mit der Methode der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erfaßt werden; bei Hormonregulation über Induktion verändert das hormonell beeinflußte Sub-

stratangebot darüber hinaus die Enzymkapazität. Bei der vorliegenden Untersuchung werden verschiedene Na^+-K^+-ATPase-Aktivitäten gemessen, obwohl in jedem Reaktionsansatz gleiche, optimale ATP- und Na^+-Konzentrationen vorhanden sind. (ATP liegt mit 2 mM weit über der Sättigungskonzentration des Enzyms (22) und bleibt während der Na^+-K^+-ATPase-Inkubation im Reaktionsansatz praktisch konstant (53)). Die hier beobachteten Änderungen der Enzymaktivität (die der Zellkapazität entspricht) sind demnach unabhängig von der Substratkonzentration zustande gekommen. Aldosteron hat also, über das AIP, primär auf die Pumpe eingewirkt und nicht auf Energiebereitstellung oder Permeabilität.

4. Schlußfolgerung

Die Diskussion sollte, in den Abschnitten über die Induktionshypothese und über die Funktion des AIP, den Stellenwert der Na^+-K^+-ATPase in der Regulation des Na^+-Transports durch Aldosteron aufzeigen, und damit den Zusammenhang, in dem die experimentellen Befunde der vorliegenden Arbeit gesehen werden müssen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstützen die These, daß Aldosteron zur Steuerung des renalen Na^+-Transports die Na^+-K^+-ATPase reguliert. Die Übereinstimmung der Latenzzeit beider Hormoneffekte wird bestätigt. Voraussetzung für die aldosteronbedingte Stimulation im DTI ist der intakte Ablauf der DNA-abhängigen RNA-Synthese. Die Na^+-K^+-ATPase wird also, wie der Na^+-Transport, über die Induktion eines Proteins beeinflußt.

Die Regulation zielt offenbar primär auf das Pumpenzym-Molekül ("Pumptheorie") und nicht auf die Verfüg-

barkeit seiner Substrate. Ein weiterer Angriffspunkt von Aldosteron am Energiestoffwechsel ist aufgrund zahlreicher Befunde wahrscheinlich (s.S.29f). Demnach käme dem Hormon eine "multifunktionale" Wirkung in der Zelle zu.

Die Pumpe selbst wird, für den Soforteffekt von Aldosteron, wahrscheinlich über Aktivierung latenter Enzymmoleküle reguliert. Chronische Mineralocorticoideinwirkung dürfte zu einer Neusynthese des Pumpenzyms führen, wodurch die resorptive Kapazität für Na^+ vergrößert würde.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem RNA-Synthesehemmer Actinomycin D wurde der Mechanismus der Wirkung von Aldosteron auf das Na^+-Transportenzym Na^+-K^+-ATPase im Nephron untersucht.

13 ca. 200 g schwere männliche Wistar-Ratten wurden in 5 Gruppen mit verschiedener Kombination von Adrenalektomie, Aldosteron (6 µg/100 g) und Actinomycin D (100 µg /100 g) in vivo vorbehandelt. Einzelne Tubulusquerschnitte von proximalem Konvolut (PTC) und dickem aufsteigenden Teil der Henle'Schleife (DTI) wurden durch Mikrodissektion aus lyophilisierten Nierenschnitten gewonnen. Die Aktivität der Tubulus-Na^+-K^+-ATPase wurde mit einer mikrobiochemischen Analyse bestimmt, mit Hilfe von Öltröpfchen-Technik, einer enzymatischen Verstärkerreaktion (dem $NADPH_2$-Cycling) und fluorimetrischer Messung.

Die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität sank nach Adrenalektomie im DTI auf ca. 60% des Normalwerts, im PTC auf 0. Aldosteron brachte sie innerhalb von 60-90 min auf den Normalwert zurück (PTC) bzw. darüber hinaus (DTI). Actinomycin D unterdrückte diese Aldosteronstimulation im DTI, im PTC beeinflußte es sie nicht. Beim gesunden Tier wurde die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität durch Actinomycin D nicht verändert.

Für den DTI ist damit nachgewiesen, daß die Aldosteronwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase den intakten Ablauf der DNA-abhängigen RNA-Synthese voraussetzt. Im PTC war möglicherweise nur aus methodischen Gründen ein Suppressionseffekt von Actinomycin D nicht zu erfassen.

Aldosteron stimuliert die Na^+-K^+-ATPase demnach über den Weg der Protein-Induktion. Dieser Mechanismus ist

für die Aldosteronwirkung auf die renale Na^+-Resorption gesichert. Da die Na^+-K^+-ATPase demselben Mechanismus unterliegt, könnte sie in die Aldosteronregulation des Na^+-Transports direkt eingeschaltet sein. Die Funktion des von Aldosteron induzierten Proteins dabei ist umstritten. Wahrscheinlich erfolgt die Sofortsteuerung über Aktivierung latenter Pumpenzym-Moleküle und führt chronische Aldosteronwirkung zu Enzymneusynthese.

ZAHLENTABELLEN

1) PTC

Gruppe	Aktivitätswerte (MKH) Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Normal	6,14	2,93	3,21
	5,13	2,32	2,81
	5,81	3,06	2,75
	4,30	3,95	0,35
	4,15	4,81	-0,66
	5,66	4,65	1,01
	7,27	5,20	2,07
	4,91	4,39	0,52
	$\bar{x}$ 5,42	3,91	1,51
	s ±1,03	±1,03	±1,40
Normal+ Actinomycin	4,13	2,83	1,30
	4,74	3,04	1,70
	4,71	4,66	0,05
	3,57	3,97	-0,40
	4,56	3,78	0,78
	5,88	3,71	2,17
	4,23	2,60	1,63
	4,32	5,03	-0,71
	5,66	2,84	2,82
	2,41	2,52	-0,11
	$\bar{x}$ 4,42	3,50	0,92
	s ±0,99	±0,88	±1,19
Adrenal- ektomie	2,50	4,99	-2,49
	3,86	5,56	-1,70
	5,80	5,96	-0,16
	4,86	4,01	0,85
	5,54	5,28	0,26
	5,23	5,49	-0,26
	5,69	4,88	0,81
	$\bar{x}$ 4,78	5,17	-0,38
	s ±1,20	±0,63	±1,26

Gruppe	Aktivitätswerte (MKH) Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Adrenalektomie+ Aldosteron	6,18	4,78	1,40
	7,26	4,25	3,01
	6,29	4,14	2,15
	4,77	4,24	0,53
	4,01	3,19	0,82
	5,85	4,14	1,71
	8,29	3,36	4,93
	6,25	5,69	0,56
	5,97	5,03	0,94
	5,80	3,83	1,97
	5,25	4,88	0,37
	5,92	4,46	1,46
	6,20	3,76	2,44
	$\bar{x}$ 6,00	4,29	1,71
	s ±1,05	±0,69	±1,26
Adrenalektomie+ Actinomycin+ Aldosteron	5,75	4,07	1,68
	6,19	4,98	1,21
	7,84	6,12	1,72
	5,50	3,38	2,12
	5,55	3,41	2,14
	5,82	2,96	2,86
	9,03	4,18	4,85
	4,15	3,48	0,67
	5,10	3,23	1,87
	6,38	3,35	3,03
	4,51	4,51	0,00
	4,02	2,50	1,52
	5,43	4,26	1,17
	$\bar{x}$ 5,79	3,88	1,91
	s ±1,40	±0,96	±1,20

Signifikanzprüfung

Vergleich der Gruppen	Unterschied
Normal mit Normal+Actinomycin ($U = 30$, $\nu = 20$)	nicht signifikant
Normal mit Adrenalektomie ($U = 9$, $\nu = 13$)	signifikant
Adrenalektomie mit Adrenalektomie+Aldosteron ($U = 7$, $\nu = 24$)	signifikant
Adrenalektomie+Aldosteron mit Adrenalektomie+Actinomycin+ Aldosteron ($U = 73$, $\nu = 51$)	nicht signifikant

2) DTI

Gruppe	Aktivitätswerte (MKH)		
	Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Normal	12,23	9,17	3,06
	10,40	7,12	3,28
	12,87	7,99	4,88
	13,53	7,06	6,47
	5,89	7,95	-2,06
	10,48	5,91	4,57
	10,74	8,64	2,10
	12,75	9,64	3,11
$\bar{x}$	11,11	7,94	3,18
s	$\pm$2,43	$\pm$1,22	$\pm$2,52

Gruppe		Aktivitätswerte (MKH) Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Normal+ Actinomycin		9,16	9,14	0,02
		12,22	7,27	4,95
		14,27	9,71	4,56
		10,15	7,71	2,44
		8,44	7,37	1,07
		15,69	7,65	8,04
	$\bar{x}$	11,66	8,14	3,51
	s	±2,91	±1,02	±2,93
Adrenalek-tomie		10,34	8,46	1,88
		12,77	7,85	4,92
		11,17	10,09	1,08
		10,77	10,86	-0,09
		11,39	5,30	6,09
		11,36	6,88	4,48
		9,04	7,70	1,34
		8,99	12,95	-3,96
	$\bar{x}$	10,73	8,76	1,97
	s	±1,27	±2,43	±3,22
Adrenalek-tomie+ Aldosteron		10,06	6,42	3,64
		9,68	6,25	3,43
		12,62	4,78	7,84
		11,74	9,84	1,90
		10,62	6,59	4,03
		13,57	6,72	6,85
		8,66	5,35	3,31
		9,67	3,50	6,17
		12,12	5,27	6,85
	$\bar{x}$	10,97	6,08	4,89
	s	±1,62	±1,75	±2,06

Gruppe	Aktivitätswerte (MKH)		
	Total-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Adrenalek-	10,49	8,08	2,41
tomie+	9,03	8,25	0,78
Actinomycin+	9,35	7,08	2,27
Aldosteron	9,52	6,99	2,53
	9,24	7,87	1,37
	8,89	7,46	1,43
	13,43	8,72	4,71
	8,07	5,30	2,77
	8,36	4,77	3,59
	7,97	5,04	2,93
	$\bar{x}$ 9,44	6,96	2,48
	s $\pm$1,59	$\pm$1,43	$\pm$1,14

Signifikanzprüfung

Vergleich der Gruppen	Unterschied
Normal mit Normal+Actinomycin ($U = 24$, $\nu = 10$)	nicht signifikant
Normal mit Adrenalektomie ($U = 23$, $\nu = 15$)	nicht signifikant
Adrenalektomie mit Adrenal-ektomie+Aldosteron ($U = 15$, $\nu = 18$)	signifikant
Adrenalektomie+Aldosteron mit Adrenalektomie+Actinomycin+ Aldosteron ($U = 12$, $\nu = 24$)	signifikant

LITERATURVERZEICHNIS

1. Castles, T.R., and H.E. Williamson. Stimulation in vivo of renal RNA-synthesis by aldosterone. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 119, 308-311, 1965

2. Charney, A.N., P. Silva, A. Besarab, and F.H. Epstein. Separate effects of aldosterone, DOCA, and methylprednisolone on renal Na-K-ATPase. Am.J.Physiol. 227, 345-350, 1974

3. Chignell, C.F., and E. Titus. Effect of adrenal steroids on a Na^+- and K^+-requiring adenosine triphosphatase from rat kidney. J.Biol.Chem. 241, 5083-5089, 1966

4. Doucet, A., and A.I. Katz. Short-term effect of aldosterone on Na-K-ATPase in single nephron segments. Am.J.Physiol. 241, F 273 - F 278, 1981

5. Doucet, A., and A.I. Katz. Mineralocorticoid receptors along the nephron: (^3H) aldosterone binding in rabbit tubules. Am.J.Physiol. 241, F 605 - F 611, 1981

6. Ebel, H., and A. Gebhardt. Protein metabolism of renal basolateral membranes in rat. Int.J.Biochem. 12, 315-318, 1980

7. Edelman, I.S., R. Bogoroch, and G.A. Porter. On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 50, 1169-1177, 1963

8. Edelman, I.S., and D. Marver. Mediating events in the action of aldosterone.
J.Steroid Biochem. 12, 219-224, 1980

9. Fimognari, G.M., D.D. Fanestil, and I.S. Edelman. Induction of RNA and protein synthesis in the action of aldosterone in the rat.
Am.J.Physiol. 213, 954-962, 1967

10. Funder, J.W., D. Feldman, and I.S. Edelman. The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone.
Endocrinology 92, 994-1004, 1973

11. Garg, L.C., M.A. Knepper, and M.B. Burg. Mineralocorticoid effects on Na-K-ATPase in individual nephron segments.
Am.J.Physiol. 240, F 536 - F 544, 1981

12. Gross, F., and J. Möhring. Renal pharmacology, with special emphasis on aldosterone and angiotensin.
Annu.Rev.Pharmacol. 13, 57-90, 1973

13. Harth, O. Nierenfunktion. In: Physiologie des Menschen, Hrsg. Schmidt, R.F., und G. Thews, 19. Aufl. 1977, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York

14. Hendler, E.D., J. Torretti, L. Kupor, and F.H. Epstein. Effects of adrenalectomy and hormone replacement on Na-K-ATPase in renal tissue.
Am.J.Physiol. 222, 754-760, 1972

15. Hierholzer, K., and H. Stolte. The proximal and distal tubular action of adrenal steroids on Na reabsorption.
Nephron 6, 188-204, 1969

16. Hill, J.H., N. Cortas, and M. Walser. Aldosterone action and sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase in toad bladder.
J.Clin.Invest. 52, 185-189, 1973

17. Horster, M., T. König, H. Schmid, and U. Schmidt. Nephron electrolyte transport and sodium-potassium adenosine triphosphatase activity: influence of nicotine in rat and rabbit.
J.Physiol. 295, 353-363, 1979

18. Horster, M., H. Schmid, and U. Schmidt. Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits.
Pflügers Arch. 384, 203-206, 1980

19. Ikeda, F., Y. Ikeda, C. Inagaki, and S. Takaori. Effect of aldosterone on renal Na-K-activated adenosine-triphosphatase activity in non-adrenalectomized rats.
Japan.J.Pharmacol. 29, 138-141, 1979

20. Jørgensen, P.L. Regulation of the ($Na^+ + K^+$) activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney. I. The effect of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system.
Biochim.Biophys.Acta 151, 212-224, 1968

21. Jørgensen, P.L. Regulation of the (Na^+ - K^+)-activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney. II. The effect of aldosterone on the activity in kidneys of adrenalectomized rats. Biochim.Biophys.Acta 192, 326-334, 1969

22. Jørgensen, P.L. The role of aldosterone in the regulation of (Na^+ + K^+)-ATPase in rat kidney. J.Steroid Biochem. 3, 181-191, 1972

23. Kinne, R., und R. Kirsten. Der Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme in der Rattenniere. Pflügers Arch. 300, 244-254, 1968

24. Kirsten, R., J. Assmutat, K. Nelson, and U. Rüschendorf. Effect of aldosterone on incorporation of (^3H)leucine into brush border membranes of rat kidney. Int.J.Biochem. 12, 319-324, 1980

25. Kirsten, R., and E. Kirsten. Redox state of pyridine nucleotides in renal response to aldosterone. Am.J.Physiol. 223, 229-235, 1972

26. Kirsten, R., K. Nelson, E. Rabah, U. Rüschendorf, Th. Scholz, J. Stüve, and R. Ulbricht. Response of renal lipid metabolism to aldosterone. Curr.Probl.Clin.Biochem. 8, 389-396, 1978

27. Kirsten, R., K. Nelson, U. Rüschendorf, W. Seger, Th. Scholz, and E. Kirsten. Effects of aldosterone on lipid metabolism and renal oxygen consumption in the rat.
Pflügers Arch. 268, 189-194, 1977

28. Knox, W.H., and A.K. Sen. Mechanism of action of aldosterone with particular reference to (Na + K)-ATPase.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 242, 471-488, 1974

29. Kramer, H.J., und F. Krück. Pharmakologische Grundlagen der Diuretikatherapie.
Med.Klin. 69, 68-73, 1974

30. Kyte, J. Immunoferritin determination of the distribution of (Na^+ + K^+) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. I. Distal segment.
J.Cell Biol. 68, 287-303, 1976

31. Kyte, J. Immunoferritin determination of the distribution of (Na^+ + K^+) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. II. Proximal segment.
J.Cell Biol. 68, 304-318, 1976

32. Lahav, M., T. Dietz, and I.S. Edelman. The action of aldosterone on sodium transport: further studies with inhibitors of RNA and protein synthesis.
Endocrinology 92, 1685-1699, 1973

33. Laird, R., and R. Yates. Ultrastructural observations on the aldosterone-stimulated toad urinary bladder epithelium - ATPase activity.
J.Ultrastruct.Res. 44, 339-346, 1973

34. Landon, E.J., N. Jazab, and L. Forte. Aldosterone and sodium-potassium-dependent ATPase activity of rat kidney membranes.
Am.J.Physiol. 211, 1050-1956, 1966

35. Law, P.Y., and I.S. Edelman. Effect of aldosterone on incorporation of amino acids into renal medullary proteins.
J.Membrane Biol. 41, 15-40, 1978

36. Law, P.Y., and I.S. Edelman. Induction of citrate synthase by aldosterone in the rat kidney.
J.Membrane Biol. 41, 41-64, 1978

37. Leaf, A., and A.D.C. Macknight. The site of the aldosterone induced stimulation of sodium transport.
J.Steroid Biochem. 3, 237-245, 1972

38. Le Hir, M., U.C. Dubach, B. Kaissling, and W. Kriz. Changes of Na^+, K^+-ATPase in three segments of the distal rabbit nephron after increase of mineralocorticoids in vivo. (Abstract).
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 9, 212, 1980

39. Lifschitz, M.D., R.W. Schrier, and I.S. Edelman. Effect of actinomycin D on aldosterone - mediated changes in electrolyte excretion. Am.J.Physiol. 224, 376-380, 1973

40. Liu, D.K., C.C. Liew, and A.G. Gornall. Effects of aldosterone on mitochondrial enzyme(s) and cytochromes of rat tissues. Can.J.Biochem. 50, 1219-1225, 1972

41. Losert, W., G. Schultz, R. Sitt, K.v. Bergmann, M. Hoffmann, P. Marx, A. Zesch und H.K. Bartelheimer. Neuere Befunde zum Wirkungsmechanismus von Aldosteron und Diuretica. Arzneimittelforsch. 19, 709-719, 1969

42. Marver, D., D. Goodman, and I.S. Edelman. Relationships between renal cytoplasmic and nuclear aldosterone-receptors. Kidney Int. 1, 210-223, 1972

43. Morris, D.J., and R.P. Davis. Aldosterone: current concepts. Metabolism 23, 473-494, 1974

44. Porter, G.A. Action of aldosterone on transepithelial sodium transport. Basic Life Sci. 6, 105-141, 1975

45. Rossier, B.C., P.A. Wilce, and I.S. Edelman. Kinetics of RNA labeling in toad bladder epithelium: effects of aldosterone and related steroids. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71, 3101-3105, 1974

46. Sachs, L. Statistische Auswertungsmethoden. 2. Aufl. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1969

47. Schmid, H., A. Mall, M. Scholz, and U. Schmidt. Unchanged glycolytic capacity in rat kidney under conditions of stimulated gluconeogenesis. Determination of phosphofructokinase and pyruvate kinase in microdissected nephron segments of fasted and acidotic animals. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 819-827, 1980

48. Schmid, H., U. Schmidt, and J. Schmid. Hormonal effects on Na-K-ATPase of various parts of the rat nephron. Curr.Probl.Clin.Biochem. 4, 214-217, 1975

49. Schmidt, U., and U.C. Dubach. Activity of (Na^+K^+)-stimulated adenosintriphosphatase in the rat nephron. Pflügers Arch. 306, 219-226, 1969

50. Schmidt, U., and U.C. Dubach. NaK stimulated adenosinetriphosphatase: intracellular localisation within the proximal tubule of the rat nephron. Pflügers Arch. 330, 265-270, 1971

51. Schmidt, U., and U.C. Dubach. Quantitative Histochemie am Nephron. In: Progr.Histochem.Cytochem. 2, 185-298, 1971; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/ Portland - Oregon - USA, 1971

52. Schmidt. U., and U.C. Dubach. Sensitivity of NaK adenosinetriphosphatase activity in various structures of the rat nephron: studies with adrenalectomy.
Europ.J.Clin.Invest. 1, 307-312, 1971

53. Schmidt, U., and H.A. Habicht. Localization and function of Na-K-ATPase activity in various structures of the nephron. In: Bolis , L., J.F. Hoffmann, and A. Leaf (Ed.), Membranes and Disease. Raven Press, New York, 1976

54. Schmidt, U., H. Schmid, B. Funk, and U.C. Dubach. The function of Na-K-ATPase in single portions of the rat nephron.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 242, 489-500, 1974

55. Schmidt, U., J. Schmid, H. Schmid, and U.C. Dubach. Sodium- and potassium-activated ATPase. A possible target of aldosterone.
J.Clin.Invest. 55, 655-660, 1975

56. Scholer, D.W., T. Mishina, and I.S. Edelman. Distribution of aldosterone receptors in rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments.
Am.J.Physiol. 237, F 360 - F 366, 1979

57. Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane.
Physiol.Rev. 45, 596-617, 1965

58. Stokes, J.B., M.J. Ingram, A.D. Williams, and D. Ingram. Heterogeneity of the rabbit collecting tubule: localization of mineralocorticoid hormone action to the cortical portion.
Kidney Int. 20, 340-347, 1981

59. Stolte, H., J.P. Brecht, M. Wiederholt, und K. Hierholzer. Einfluß von Adrenalektomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität corticaler Nephronabschnitte der Rattenniere.
Pflügers Arch. 299, 99-127, 1968

60. Wallick, E.T., L.K. Lane, and A. Schwartz. Biochemical mechanism of the sodium pump.
Ann.Rev.Physiol. 41, 397-411, 1979

61. Wiederholt, M. Mikropunktionsuntersuchungen am proximalen und distalen Konvolut der Rattenniere über den Einfluß von Actinomycin D auf den mineralocorticoidabhängigen Na-Transport.
Pflügers Arch. 292, 334-342, 1966

62. Wiederholt, M., W. Schoormans, L. Hansen, and C.Behn. Sodium conductance changes by aldosterone in the rat kidney.
Pflügers Arch. 348, 155-165, 1974

63. Wiederholt, M., H. Stolte, J.P. Brecht, und K. Hierholzer. Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenalektomierter Ratten.
Pflügers Arch. 292, 316-333, 1966

64. Williamson, H.E. Mechanism of the antinatriuretic action of aldosterone.
Biochem.Pharmacol. 12, 1449-1450, 1963

NACHWORT

Herrn Prof. Dr. med. U. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Prof. Dr. med. A. Bohle für die Betreuung bei der Fertigstellung der Arbeit. Frau Dr. rer. nat. H. Schmid möchte ich meinen Dank aussprechen für die fruchtbare wissenschaftliche Diskussion, Herrn Dr. med. W. Grewenig für die Beratung bei der Erstellung der Statistik.

LEBENSLAUF

Am 23. 1. 1952 wurde ich, Jutta Schmid geb. Burchartz, als Tochter des Alfred Burchartz, Katechet, und seiner Ehefrau Lilli geb. Zaminer, Lehrerin, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren. Nach dem Besuch der Grundschule (1958–62) und des Max-Planck-Gymnasiums (1962–70) in Nürtingen legte ich am 18. 6. 1970 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen, wo ich am 29. 9. 71 die naturwissenschaftliche, am 6. 4. 73 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Seit dem 22. 12. 72 bin ich mit Harald Schmid, Arzt, verheiratet. Die Experimente der vorliegenden Arbeit führte ich im Biochemischen Labor des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen durch, unter der Leitung von Prof. Dr. med. U. Schmidt (Juli 1973–April 1974). Zum Wintersemester 1974/75 wechselte ich an die Universität Marburg über, wo ich am 16. 12. 76 die ärztliche Prüfung nach BOÄ ablegte. Während der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich an der Eastern Clinic in Mobai, Sierra Leone (Februar–Mai 77), an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg (Sept.–Dez. 77), an der Hautklinik der Universität Marburg (März–Juni 78) und an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Frankenberg (Sept.–Dez. 78). Die Approbation erhielt ich am 13. 2. 1979. Seither befinde ich mich in der Weiterbildung zum Arzt für Allgemeinmedizin. Ich arbeitete als Assistenzärztin an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Frankenberg (Februar–Juli 79), an der Gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung desselben Hauses (August 79–März 80), an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg (April 80–Sept. 81) und in einer Landpraxis in Gladenbach (Mai–Juli 82); zwischenzeitlich übernahm ich Landpraxisvertretungen.

Druck: Erich Mauersberger, Marburg